应用CRISPR/Cas9技术构建miR-362敲除的95-D肺癌细胞株

罗丹 1[1]，王莉娟 2[2]，孙秀璇 3[2]，张征 4[2]，陈志南 5[1*]

（1 北京交通大学 理学院 生命科学与生物工程研究院，北京 100044；

2 第四军医大学 细胞工程研究中心，西安 710032）

*通讯作者

摘 要：目的 运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，建立 miR-362 基因敲除的 95-D 肺癌细胞株，并研究 miR-362 在肿瘤中的调控作用。方法 针对人源 miR-362 基因序列设计 gRNA，构建 px330-gRNA 载体；T7E1 assay 确定 gRNA 的有效性。分别扩增 miR-362 上下游同源臂序列构建 donor 载体。利用脂质体将 CRISPR 系统和 donor 载体共转至人肺癌细胞系 95-D，通过同源重组方法将筛选标志基因整合至基因组中，通过流式分选以及 qPCR 方法检测筛选出的细胞中 miR-362 表达水平。利用 Transwell 分析 miR-362 对细胞运动能力的影响。结果 与 95-D 细胞相比，95-D-KnockDown 细胞中 miR-362 表达水平显著降低，且迁移侵袭能力分别下降了 53.1%（p=0.0006）和 48.3% （p=0.0002）。结论 利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 miR-362 基因敲除的 95-D 细胞，miR-362 可促进细胞的运动能力，为后续研究 miR-362 在肿瘤中的作用机制和功能奠定了基础。

关键词：miR-362；95-D；CRISPR/Cas9；侵袭；迁移

中图分类号：Q2　　　文献标志码：A

基金项目：国家自然科学基金（81572817）

第一作者：罗丹（1984-），女，河南沁阳人，博士研究生，研究方向为系统生物学，email：luodan997@163.com

通讯作者：陈志南，男，院士，email：znchen@fmmu.edu.cn

Construction of miR-362 knockdown 95-D cell line by CRISPR/Cas9 technology

LUO Dan[1], *WANG Li-juan*[2], *SUN Xiu-xuan*[2], *ZHANG Zheng*[2], *CHEN Zhi-nan*[1*]

(1. College of Life Science and Bioengineering, School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China; 2. Cell Engineering Research Center, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

*Corresponding author

Abstract: Objective: to construct miR-362 knockdown 95-D cells by using CRISPR/Cas9 genome engineering technology, and study the function of miR-362 in cancer. **Methods:** gRNA sequences targeting the miR-362 gene were selected. Px330-gRNA recombination plasmids were constructed and the validity were evaluated by T7E1 assay. Left and right arms of miR-362 were amplified from genomic DNA by PCR, and sequentially cloned into the donor vector. The CRISPR/Cas9 system and donor vector were co-transfection into 95-D cells, and the selection system that allows for marker genes were integrated into the genome through homologous recombination (HR). The expression of miR-362 of 95-D-KnockDown cells sorted through FACS was detected by qPCR, and the migration and invasion were determined by Transwell assay. **Results:** Compared with 95-D cells, the expression of miR-362 in 95-D-KD cells was significantly down-regulated, and down-regulation of miR-362 expression can suppress the cell migration and invasion capacity of 95-D-KD cells. **Conclusion:** The miR-362 knockdown lung cancer cell line（95-D-KD cells）had been successfully constructed by

using CRISPR/Cas9 system, which lays the foundation for further study of the mechanism and function of miR-362 in cancers.

Key words: miR-362; 95-D; CRISPR/Cas9; invasion; migration

肺癌是我国常见的、发病率和致死率均居首位的恶性肿瘤[1]。肺癌的发生发展是缓慢而持续的过程，涉及染色体稳定性、表观遗传学改变、基因表达调控等多因素、多信号通路的共同参与。近年来，随着高通量测序技术的发展，尤其是基因组、转录组等研究的不断深入，包括 miRNAs 在内的非编码 RNA 在肿瘤发生发展中的作用也受到人们的关注。

MicroRNAs(miRNAs)是一类非编码小分子 RNA，通过与沉默复合体（RISC）结合介导靶基因 mRNA 降解或阻碍其翻译[2]。研究表明 miRNAs 在肿瘤细胞中广泛存在，并发挥着重要的促癌因子或抑癌因子的作用[3-5]。MiR-362 定位于人基因组 Xp11.23。研究表明，miR-362 在胃癌中可作为促癌因子，通过激活 NF-kB 通路诱导细胞增殖和凋亡耐受[6]; 然而，也有研究证明，miR-362 在神经母细胞瘤中作为肿瘤抑制子，通过靶向 PIK3C2B 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移[7]。为了明确 miR-362 在非小细胞肺癌演进中的作用机制，有必要建立完全敲除的细胞株。

基因编辑技术为在基因组水平进行定点操作提供了良好的方法。目前，常用的基因组编辑技术除了锌指蛋白 (zinc finger protein, ZFP) 技术、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases，TALEN) 技术以外，RNA 引导的 CRISPR/Cas9 核酸酶技术在基因编辑中的应用也越来越广泛。Cas9 系统是微生物自我保护，防止外来微生物的侵入的一种独特机制，它是继 ZFN 和 TALEN 之后出现的更为快捷和有效的基因编辑工具。目前已发现的有三种 CRISPR/Cas9 系统，其中 II 型系统研究最为深入，应用最为广泛，其可产生抗噬菌体的嗜热链球菌菌株（*Streptococcus thermophiles strains*）。该系统通过 Cas9 核酸内切酶在特定的靶向序列处引入双链断裂的 (double strand break, DSB) DNA 缺

口，继而通过细胞内 NHEJ 途径 (non-homologous end joining, NHEJ) 和同源重组（homologous recombination，HR） 途径两种 DNA 修复机制完成修复，其中 NHEJ 途径使基因组在 DNA 缺口处有碱基的插入或者缺失，造成移码突变，导致基因的敲除。而 HR 途径则以外源 DNA 为模板，使基因组 DNA 得到精确的基因修复或靶向基因的添加。

本研究采用了 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术，通过同源重组途径，并结合 Cre/LoxP 系统构建了 miR-362 敲除的 95-D 细胞株；并利用 Transwell 方法初步证明 miR-362 可促进非小细胞肺癌的迁移和侵袭，为进一步研究 miR-362 在非小细胞肺癌中的作用机制和功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞系 95-D 为本实验室冻存。PX330 质粒（Addgene 公司），donor vector (Mo Yin-yuan 惠赠)，试剂：限制性内切酶 BbsI、T4 连接酶（NEB 公司），质粒 DNA 小提试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒（Omega-biotek 公司），转染试剂 Lipofectamine 2000（Invitrogen 公司），miScript II RT kit 和 miScript SYBR® Green PCR Kit（QIAGEN）。

1.2 方法

1.2.1. 质粒构建

基于 pre-miR-362 基因组序列，本文利用在线工具 CRISPR design (http://crispr.mit.edu/) 查找潜在的 sgRNA 序列，并在正义链的 5’端添加 CACC，反义链的 5’端添加 AAAC（表 1），与 BbsI 酶切后形成的粘性末端互补。所有寡核苷酸链均由生工合成。将 sgRNA 寡核苷酸链经退火（ 95℃，5 min 后自然降至室温），连入经 Bbs I 酶切回收的 pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 表达载体。转化感受态细胞挑取单克隆，小提质粒并测序验证（由华大基因公司完成）。

为构建 miR-362 的 donor vector，我们利用 *pfu* DNA 聚合酶从基因组 DNA 中分别扩增了 miR-362 的上下游同源臂（~800bp），所用引物见表 1，并插入到 donor vector 中，转化感受态细胞挑取单克隆，小提质粒并测序验证（由华大基因公司完成）。

1.2.2 T7 endonuclease I 酶切实验

将构建的 PX330-gRNA 载体分别转染至 95-D 细胞，培养 48 小时后，利用 DNA 提取试剂盒（天根）提取基因组 DNA。利用引物 362-seq-5.1 和 362-seq-3.1（表 1）扩增含 sgRNA 作用靶点的 DNA 片段。反应条件: 95℃ 5 min; (95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s) × 30; 72℃ 10 min。用 PCR 纯化试剂盒（Omega bio-tek）纯化 PCR 产物。取 200 ng 纯化 PCR 产物在 NEB Buffer 2 中变性、复性，反应条件变性 95℃，5min，退火 95-85°C （-2°C/秒），85-25°C （-0.1°C/秒）后，用 T7 核酸内切酶(NEB，M0302L) 37℃ 孵育 15 min， 然后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离，凝胶成像。

1.2.3 细胞转染和筛选

将 95-D 细胞以 5×10^5/孔接种至 6 孔板中培养至细胞汇合度达到 60%~70%，用 lipofectamine2000 将 PX330-gRNA 和 DONOR-362 共转入细胞中。培养一周后用 0.5μg/ml 嘌呤霉素进行加压筛选。筛选两周后，利用流式细胞仪将依据 GFP 信号将单个细胞分选至 96 孔板继续培养 2-3 周。分选获得的细胞经扩大培养后冻存。

1.2.4 用 Cre 酶去除重组 LoxP 位点

利用 HiScribe T7 ARCA mRNA Kit (with tailing) （NEB 公司）按照说明书操作合成 Cre mRNA。简要描述如下，利用引物 Cre-5.1-HindIII 和 Cre-3.1-XhoI 通过 PCR 扩增获得含有 T7 启动子区的 Cre 编码区。以纯化后的 PCR 片段产物为模板合成 Cre mRNA。将前述筛选得到的 95-D-KD-GFP 的细胞种于 6 孔板中过夜培养后，将 3μg Cre mRNA 转染至细胞。转染 3 天后扩大培养。利用流式细胞仪分选不含绿色荧光的细胞。

1.2.5 RNA 提取及实时定量 PCR

用 Trizol（Thermo Fisher scientific）分别提取野生型和敲除型 95-D 细胞的总 RNA，利用 miScript II RT kit（QIAGEN）逆转录成 cDNA，并利用 miScript SYBR® Green PCR Kit（QIAGEN）。检测 miR-362 在野生型和敲除型 95-D 细胞中的表达水平，实验以 U6 为内参。

1.2.6 Transwell 细胞迁移实验

将 95-D 和 95-D-KD 细胞用胰酶消化， PBS 洗 1-2 遍，用无血清培养基重悬，调整细胞密度至 5×10^5/ml，取细胞悬液 100μl 加入 Transwell 小室，24 孔板下室加入 500 含 10%胎牛血清的培养基，置于 37℃孵箱常规培养 20 小时后，取出小室，经淋洗、固定、染色后于显微镜下计数，每样本计数 5 个视野取平均值，实验重复 3 次，统计学分析并绘制柱状图。

1.2.7 Transwell 细胞侵袭实验

用 50mg /L Matrigel（1：5）稀释后，包被 Transwell 小室上室底部并风干，将饥饿 24h 的 95-D 和 95-D-KD 细胞常规消化离心后用无血清培养基重悬细胞，，将细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml，取细胞悬液 100μl 加入 Transwell 小室上室，24 孔板下室加入 500μl 含血清培基，置于 37℃孵箱常规培养 20 小时后，取出小室，经淋洗、固定、染色后于显微镜下计数，每样本计数 5 个视野取平均值，实验重复 3 次，统计学分析并绘制柱状图。

1.2.8 数据处理及统计学分析

实验数据用 GraphPad Prism 5.0 软件分析, 各组数据的统计学差异采用方差分析(Two-Way ANOVA)或 t 检验，P<0.01 为有显著统计学差异。

2 实验结果

2.1 sgRNA 的设计和载体构建

依据 pre-miR-362 基因序列，利用在线 sgRNA 设计软件，并分别在正义链的 5'端添加 CACC，反义链的 5'端添加 AAAC。设计合成了 7 条针对 miR-362 基因的 sgRNA 寡核苷酸

链(表 1)。经退火后形成 BbsI 的粘性末端。将 pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 载体经 BbsI 酶切回收后分别与 7 条 sgRNA 序列连接，经测序验证完成 PX330-sgRNA 载体初步构建。

为提高敲除细胞的筛选效率，我们构建了 donor 载体，拟通过同源重组将靶序列替换为标志序列（GFP 和 PU, the puromycin resistance gene）（图 1A）。该载体中 GFP 有助于利用流式分选阳性细胞，PU 基因有利于筛选稳定发生同源重组的细胞，该载体中含有的 LoxP 位点有助于在 Cre 酶的作用下将筛选获得的稳定细胞中的标志序列切除。我们利用引物 362-F-Xbal-F 与 362-F-BamH1-R 和 362-B-EcoR1-F 与 362-B-XhoI-R 分别从 95-D 细胞的基因组中通过 PCR 技术扩增了 pre-miR-362 上下游各约 800bp 的基因序列（图 1B），并将其分别连接至 donor vector 的 XbaI 和 BamH1，以及 EcoR1 和 XhoI 酶切位点。转化至 DH5α中，挑取单克隆，经测序验证完成 Donor-362 载体构建。

表1　文中引物名称及序列

Table 1　Primers and sequences in this text

Primers	Sequences (5’-3’)
gRNA1 F	CACCTGGAACCTAGGTGTGAGTGC
gRNA1 R	AAACGCACTCACACCTAGGTTCCA
gRNA2 F	CACCCAGTGCAACACACCTATTCA
gRNA2 R	AAACTGAATAGGTGTGTTGCACTG
gRNA3 F	CACCAGGTGTGAGTGCTATTTCAG
gRNA3 R	AAACCTGAAATAGCACTCACACCT
gRNA4 F	CACCGGTTCCAAGGATTCAAGAGG
gRNA4 R	AAACCCTCTTGAATCCTTGGAACC
gRNA5 F	CACCAGGTTCCAAGGATTCAAGAG
gRNA5 R	AAACCTCTTGAATCCTTGGAACCT

gRNA6 F	CACCTGCTCCCCCTCTTGAATCCT
gRNA6 R	AAACAGGATTCAAGAGGGGGAGCA
gRNA7 F	CACCGCCTCTTTGAATCCTTGAAT
gRNA7 R	AAACATTCAAGGATTCAAAGAGGC
D362-F	CCCACAAACATACACAAAAGCAT
D362-R	TGGGCACACATGTACATGCAC
Cre-5.1-HindIII	AAGCTTGCCACCatgtccaatttactgaccgtac
Cre-3.1-XhoI	CTCGAGctaatcgccatcttccagcag
362-seq-5.1	Agtaagtaccttgtgtgaagaagaatg
362-seq-3.1	Cacacatgtacatgcacatgtt

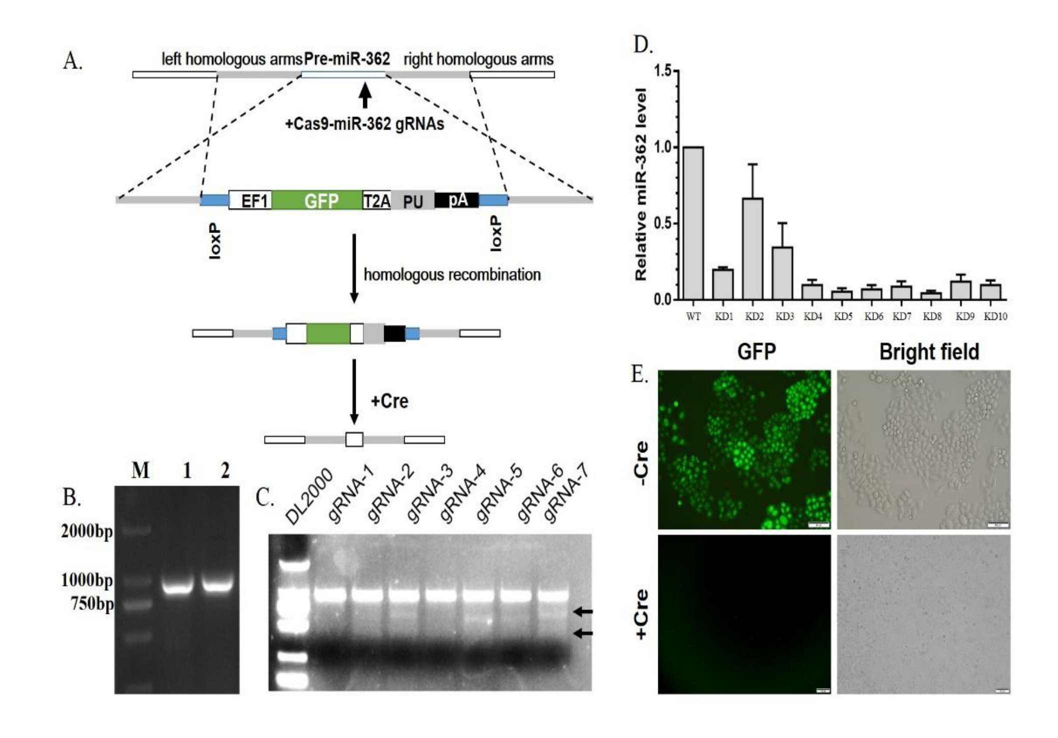


图 1.　利用 CRISPR/Cas9 系统构建 miR-362 敲除细胞系

Fig1　Construction of miR-362 knockdown cell line by CRISPR/Cas9 technology

A.　通过同源重组靶向miR-362的donor载体示意图；B. PCR扩增miR-362前、后端同源臂的凝胶电泳图；C. T7E1 assay检测细胞转染不同CRISPR系统质粒；D. 不同克隆中miR-362的表达水平；E. 荧光显微镜观察Cre删除95-D-KD细胞中标志基因结果。

A．Schematic diagram of homologous recombined donor vector targeting miR-362 .

B.　Gel electrophoresis results of miR-362 after PCR amplification of pre- and post- arm of miR-362.

C. Detection of plasmids transfected with different CRISPR systems by T7E1 assay.

D. MiR-362 expression levels in different clones.

E. Fluorescence microscopy photographes of marker genes deleted by Cre techonology in 95-D-KD cells.

2.2 T7E1 assay 检测 CRISPR 系统的剪切效率

利用脂质体将构建的不同的 px330-sgRNA 载体转染至 95-D 细胞，72 小时后提取细胞基因组 DNA，利用 PCR 方法扩增相应片段，通过 T7E1 assay 评介 CRIPSR 系统的剪切能力。结果显示： 经 T7 endonuclease I 处理后，在 sgRNA-3、-5 和-7 组中出现了两条带 (图 1C)，提示 sgRNA-3、-5 和-7 可引起靶点基因发生突变。选择 sgRNA-7 作为最终的打靶 sgRNA。

2.3 建立稳定敲除 PRE-MIR-362 的 95-D 细胞株

将 PX330-MIR362-sgRNA7 质粒和 DONOR-362 质粒共转染 95-D 细胞。为了减少 DONOR-362 载体随机整合至基因组的可能性，我们在转染 1 周后，用嘌呤霉素(0.5μg/ml)进行加压筛选。筛选 1 周后，利用流式细胞仪，根据 GFP 荧光信号将经嘌呤霉素加压筛选获得的阳性细胞分选至 96 孔板中（1 细胞/孔）。经扩大培养后，我们在 95-D 敲除细胞中随机选取了 10 个克隆。分别提取细胞 Total RNA，经 miScript reverse kit 反转录，通过实时定量 PCR 方法比较野生型 95-D 细胞和敲除型细胞中 miR-362 表达水平的差异。qRT-PCR 结果显示(图 1D)，与野生型 95-D 细胞相比，在 95-D-KO-GFP 细胞的 10 克隆中，除克隆 2 和克隆 3 以外，其余克隆株中 miR-362 的表达水平均显著低于对照细胞($P<0.001$)，表达水平降低了 50-100 倍。表明通过 CRISPR/Cas9 系统成功获得了稳定敲除 miR-362 的 95-D 肺癌细胞株。因为所构建的 DONOR 载体中含有 2 个 LoxP 位点可用于去除发生同源重组的标志序列（GFP 和 PU），我们通过体外转录获得了 Cre 重组酶 mRNA，并将其转染到 95-D-KD-GFP 细胞的克隆 8 细胞中，以去除标志序列，最终获得了不含有 GFP 荧光的 95-D-KD 细胞（图 1E)。

2.4 95-D-KD 细胞的基因序列特点分析

为明确 95-D-KD 细胞的基因序列的特点，我们利用引物 D362-F 和引物 D362-R 通过 PCR

扩增了 95-D-KD 基因组中的相应片段，通过测序分析发现，与野生型 pre-miR-362 序列相比，95-D-KD 细胞在第 53(T)和第 54 位(C)碱基间插入了长度为 161bp 的序列（图 2）。

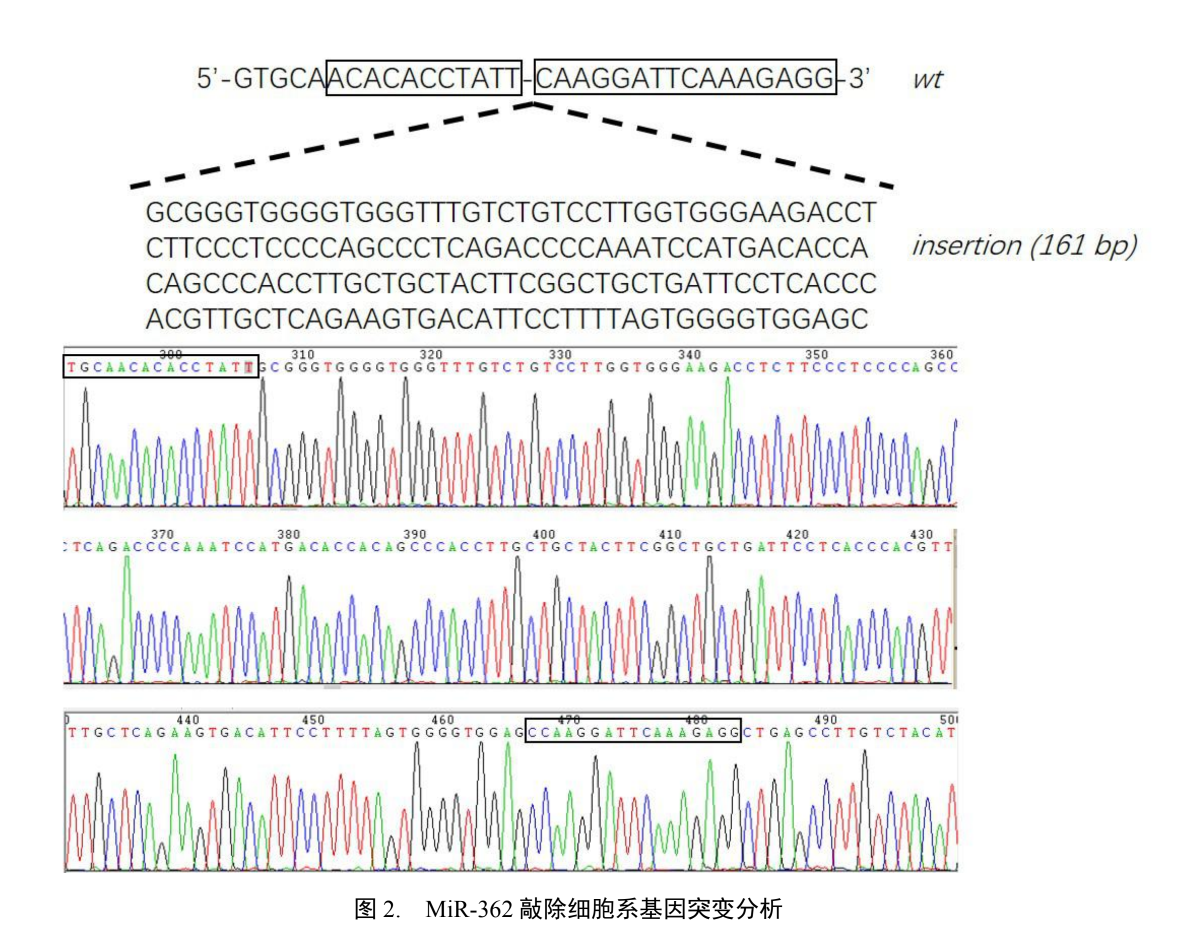


图 2. MiR-362 敲除细胞系基因突变分析

Fig2 Analysis of gene mutation in MiR-362 knockdown cell line

2.5 miR-362 敲除抑制细胞的迁移侵袭

为了探讨 miR-362 的生物学功能，我们用 transwell 方法评价了野生型 95-D 和 95-D-KD 细胞在细胞运动方面的差异。如图 3 所示，野生型 95-D 和敲除型 95-D-KD 细胞的迁移细胞数分别为 132.7±3.2 和 62.3±6.1，侵袭细胞数分别为 212.0±12.0 和 109.6±14.1。与野生型 95-D 细胞相比，95-D-KD 细胞的迁移和侵袭能力分别下降了 53.1%（p=0.0006）和 48.3%（p=0.0002）。以上结果提示，敲除 miR-362 显著抑制了 95-D 细胞的迁移和侵袭能力，miR-362 与细胞的运动能力密切相关。

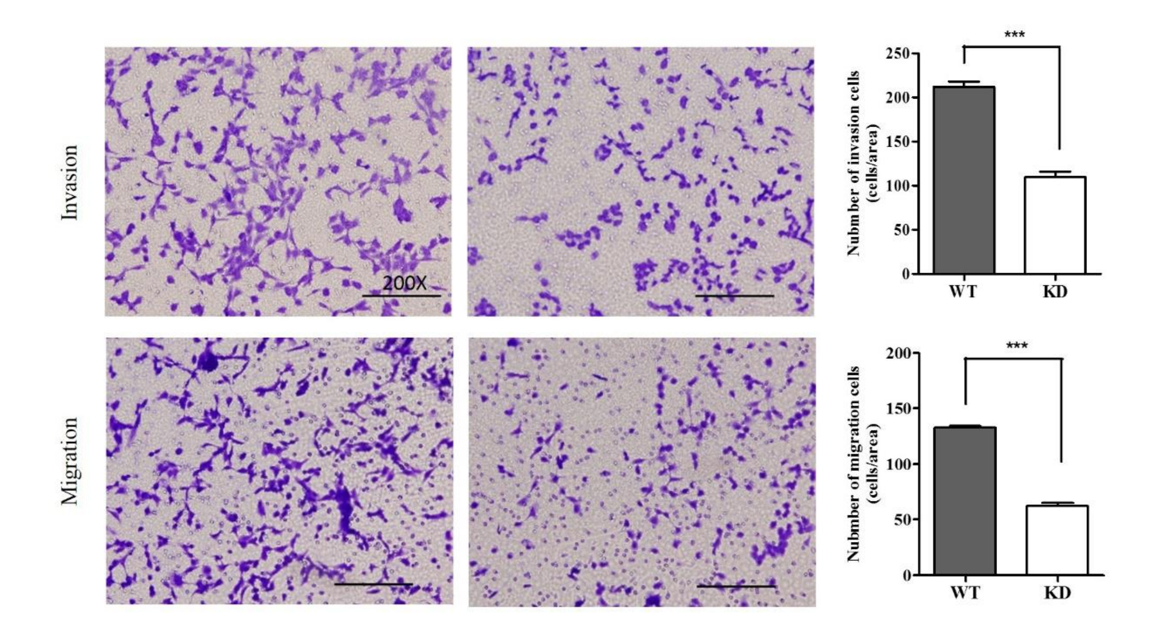


图 3. Transwell 迁移和侵袭实验

Fig3 Transwell migration and invasion experiments

3 讨论

非编码 RNA 占据了人转录组的绝大部分，然而，其生物学功能尚不十分清楚。有证据表明非编码 RNA 在多种生物学活动中发挥着作用，如细胞周期、分化、死亡等，并且在肿瘤的发生发展中也起着重要的作用。目前对非编码 RNA 生物学功能的研究多采用过表达和 RNAi 等手段，但是，RNAi 方法具有特异性差、效率不高、范围受限、作用时间有限等不足，影响了对分子功能的深入研究。而 CRISPR/Cas9 系统则可以从基因水平将靶基因彻底敲除，相比之下更具优势。

CRISPR/Cas9 系统是目前常用的基因操作工具之一，该系统包括 CRISPR 相关核酸酶和单链向导 RNA（single guide RNA，gRNA）[8]。CRISPR 是一些相互间隔的短回文重复序列，常产生发卡结构，长度为 21-48 bp[9]，每个重复序列间存在外源性 DNA 靶点中与之结构相似的短重复序列，这决定了 SRISPR 系统的种类及靶基因的识别位点[10]。在 DNA 靶点

内，每个典型间隔区与典型间隔相邻基序（protospacer adjacent motif，PAM）相邻[11]，常用的 PAM 包括 NGG、NAG 和 NNGG[12]。Cas9 核酸酶含有两个核酸酶结构域，HNH 结构域和 RuvC 样结构域，可分别切割目标 DNA 链的一条单链[13]。CRISPR/Cas9 发挥作用时，通过 PAM 序列使 gRNA 与靶位点识别，介导 Cas9 核酸酶与基因组稳定结合，引起靶位点切割，从而产生双链断裂，引起非同源末端连接（non-homologous end joining, NHEJ）或同源性定向修复(homology-directed repair, HDR)。CRISPR/Cas9 系统可以同时对靶基因进行高效的基因敲除（knock-out）和基因敲入（knock-in）编辑。

.成熟的 microRNAs 长度仅为约 22nt，在实验中，我们以 pre-miR-362 作为模板设计建立 CRISPR/Cas9 系统，DNA 测序结果表明 CRISPR/Cas9 系统作用后，在 pre-miR-362 第 53 和第 54 位核苷酸间插入了长为 161bp 的碱基(图 2)，这可能影响了 pre-miRNA 的二级结构，进而影响了 miR-362 成熟的生物加工过程，最终导致 miR-362 表达的显著下调（图 1D）。

我们的实验结果进一步证明，利用携带有靶基因上下游同源臂基因的 Donor 载体，可有效的通过同源重组的方式提高基因敲除的效率。一方面，Donor 载体中含有 GFP 和 PU 基因，GFP 有助于利用流式细胞仪分选那些发生同源重组的单克隆细胞，有利于降低实验成本和细胞所受的压力；另一方面，由于 Donor 载体中携带有靶基因的同源臂基因，使得 donor 载体不易于结合到基因组中存在有脱靶效应（off-target）的位点，从而降低了 CRISPR/Cas9 的脱靶效应[14, 15]，那些未发生同源重组的细胞在 PU 的压力筛选下得以清除，提高筛选效率。此外，在我们所采用的 Donor 载体中还含有两个 LoxP 位点，可在 Cre 酶的作用下切除 miR-362 敲除细胞中的标志序列（GFP 和 PU），使细胞不再表达 GFP，并对 PU 重新敏感，有助于再次细胞分选和筛选。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，成功构建了 95-D- miR-362 敲除细胞系，并用实时定量 PCR 方法检测了敲除效率，研究结果表明，本研究获得的敲除细胞系具有敲除效

率高、效果稳定的优点，且敲除片段插入位点明确，最大限度的减少了对于肿瘤细胞其他重要生物学功能的影响，是用于研究 miR-362 功能的理想体外细胞模型。通过侵袭及迁移实验，证明了 miR-362 在促进肺癌细胞恶性行为中的作用，与其在其他多种肿瘤细胞中的研究结果一致。但 miR-362 促进肺癌侵袭转移的具体分子机制仍需深入研究。本研究构建的体外模型为研究 miR-362 在肿瘤发生发展中的作用机制提供了重要的细胞模型。

致 谢

感谢第四军医大学细胞工程研究中心的全体科研人员。

参考文献：

[1] Liu Y, Hu X, Xia D, *et al*. MicroRNA-181b is downregulated in non-small cell lung cancer and inhibits cell motility by directly targeting HMGB1[J]. Oncol Lett, 2016,12(5):4181-4186.

[2] Garzon R, Calin G A, Croce C M. MicroRNAs in Cancer[J]. Annu Rev Med, 2009,60:167-179.

[3] Ni F, Zhao H, Cui H, *et al*. MicroRNA-362-5p promotes tumor growth and metastasis by targeting CYLD in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2015,356(2):809-818.

[4] Jung C J, Iyengar S, Blahnik K R, *et al*. Epigenetic modulation of miR-122 facilitates human embryonic stem cell self-renewal and hepatocellular carcinoma proliferation[J]. PLoS One, 2011,6(11):e27740.

[5] Nicoloso M S, Spizzo R, Shimizu M, *et al*. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases[J]. Nat Rev Cancer, 2009,9(4):293-302.

[6] Xia J T, Chen L Z, Jian W H, *et al*. MicroRNA-362 induces cell proliferation and apoptosis resistance in gastric cancer by activation of NF-kappaB signaling[J]. J Transl Med, 2014,12(1):33.

[7] Wu K, Yang L, Chen J, *et al*. miR-362-5p inhibits proliferation and migration of neuroblastoma cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase-C2beta[J]. FEBS Lett, 2015,589(15):1911-1919.

[8] Pelletier S, Gingras S, Green D R. Mouse genome engineering via CRISPR-Cas9 for study of

immune function[J]. Immunity, 2015,42(1):18-27.

[9] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats[J]. BMC Bioinformatics, 2007,8(1):172.

[10] Feng Y, Liu J, Kang Y, *et al*. miR-19a acts as an oncogenic microRNA and is up-regulated in bladder cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014,33(1):67.

[11] Ran FA, Hsu PD, Wright J, *et al*. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013,8(11):2281-2308.

[12] Xiao A, Cheng Z, Kong L, *et al*. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool[J]. Bioinformatics, 2014,30(8):1180-1182.

[13] Cong L, Ran FA, Cox D, *et al*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013,339(6121):819-823.

[14] Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, *et al*. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2014,42(11):7473-7485.

[15] Shen B, Zhang W, Zhang J, *et al*. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects[J]. Nat Methods, 2014,11(4):399-402.

作者简介：

罗丹 1 [1]，王莉娟 2 [2]，孙秀璇 3 [2]，张征 4 [2]，陈志南 5 [1*]

（1 北京交通大学 理学院 生命科学与生物工程研究院，北京 100044

2 第四军医大学 细胞工程研究中心，西安 710032）

*通讯作者

LUO Dan[1], WANG Li-juan[2], SUN Xiu-xuan[2], ZHANG Zheng[2], CHEN Zhi-nan[1*]

(1. College of Life Science and Bioengineering, School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China

2. Cell Engineering Research Center, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

*Corresponding author